

学校编码: 10384
学号: B200126012

分类号_____密级_____
UDC _____

厦 门 大 学
博 士 学 位 论 文

太平洋多金属结核区深海沉积物微生物多样性研究及宏基因组文库的构建

Microbial diversity investigation and metagenomic library construction of the deep-sea sediments collected from nodule province of Pacific

徐美香

指导教师姓名: 肖湘、徐洵 教授

专 业 名 称: 动物学

论文提交日期: 2005 年 4 月 22 日

论文答辩时间: 2005 年 5 月 10 日

学位授予日期: 2005 年 月 日

答辩委员会主席: 张玉忠

评 阅 人: 张玉忠

沈月毛 郑天凌

王风平 邵宗泽

2005 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文, 是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果, 均在论文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人: 徐美香

2005 年 4 月 18 日

目 录

中文摘要.....	I
-----------	---

英文摘要.....	IV
-----------	----

前 言

一、 序.....	1
二、 环境(深海)微生物研究方法及技术进展.....	2
三、 国际海洋微生物研究进展.....	12
四、 本论文的研究思路、意义及内容.....	25

材 料 和 方 法

一、 材料.....	32
二、 基本方法.....	40
三、 A 站点和 MP 站点深海沉积物微生物多态性调查.....	48
四、 ES0303 站点深海沉积物样品微生物宏基因组 cosmid 文库的构建和研究.....	50

结 果 与 分 析

第一部分 多金属结核区 A 站点及邻近 MP 站点深海沉积物样品微生物多态性调查

1. 深海沉积物样品 DNA 的提取.....	68
2. 深海沉积物样品古菌和细菌 16S rRNA 基因扩增.....	69
3. 微生物 16S rRNA 基因文库的构建及 RFLP 分析.....	69
4. MP 样品和 A 样品微生物多样性的分析和比较.....	71
4.1 深海沉积物 A 样品和 MP 样品中细菌多态性分析.....	71
4.2 深海沉积物 A 样品和 MP 样品中古菌群落多态性分析.....	76

5. 讨论及分析.....	83
5.1 深海沉积物 A 样品和 MP 样品古菌群落.....	84
5.2 深海沉积物 A 样品和 MP 样品细菌群落.....	85
第二部分 太平洋多金属结核区 ES0303 站点深海沉积物样品微生物宏基因组 cosmid 文库构建和研究	
1. ES0303 站点深海沉积物环境样品 DNA 制备.....	88
1.1 原位裂解法提取深海沉积物样品 DNA.....	88
1.2 深海沉积物样品大片段目的 DNA 的分离筛选.....	89
1.3 深海沉积物样品大片段目的 DNA 的回收和浓度控制.....	89
1.4 深海沉积物样品大片段目的插入 DNA 末端补平和浓度控制.....	90
2. ES0303 cosmid 宏基因组文库构建和评估.....	91
2.1 ES0303 cosmid 宏基因组文库构建.....	91
2.2 ES0303 cosmid 宏基因组文库评估.....	91
3. ES0303 cosmid 宏基因组文库及 ES0303 深海沉积物样品微生物多态性调查.....	93
3.1 16S rRNA 基因文库的构建及微生物多态性的调查.....	93
3.2 ES0303 cosmid 库和 ES0303 深海沉积物样品细菌多样性的比较.....	103
3.3 讨论及分析.....	108
3.4 总结.....	111
4. ES0303 cosmid 宏基因组文库酶类筛选和脂肪酶的研究.....	122
5. 烷烃单加氧酶基因的筛选和研究.....	113
5.1 烷烃单加氧酶基因的筛选和克隆.....	113
5.2 9E7 和 21G8 克隆子中烷烃单加氧酶基因保守片段分析.....	116
5.3 9E7 和 21G8 克隆子中包含烷烃单加氧酶基因的确证和后续研究.....	117
6. 生物活性物质的筛选和功能研究.....	120
6.1 抗细菌抗生素筛选.....	120
6.2 抗肿瘤活性物质筛选.....	122
讨 论	
1. 多金属结核区深海沉积物中微生物多样性比较分析.....	129
2. 多金属结核区 ES0303 深海沉积物微生物宏基因组 cosmid 文库的研	

究.....	131
2.1 构建文库所需大片段 DNA 提取.....	131
2.2 文库中微生物资源信息研究.....	131
3. 多金属结核区深海沉积物中的烷烃羟化酶系统.....	133
4. 深海微生物生物活性物质的开发.....	134
5. 对环境样品微生物研究的一些看法.....	135
5.1 “不可培养细菌”	135
5.2 环境基因组学技术.....	135
5.3 环境微生物研究的未来和策略.....	136
6. 结论.....	136
参 考 文 献.....	139
附 录.....	154
1、攻读博士学位期间参与的课题以及发表和待发表的论文.....	154
2、载体图谱.....	156
3、DNA 分子量标准.....	158
致 谢.....	160

CONTENTS

Chinese abstract	I
-------------------------------	---

English abstract	IV
-------------------------------	----

Forward

五、 Preface	1
六、 Development of the methods and techniques of environmental microbiology.....	2
七、 Development of marine microbiology.....	12
八、 Design, purpose and contents of this thesis.....	25

Materials and methods

I. Materials.....	32
II. Basic methods.....	40
III. Microbial diversity survey of the deep-sea sediment samples collected from A and B stations	48
IV. Microbial metagenomic cosmid library construction and subsequent research of deep-sea sediment of ES0303 station....	50

Results and discussion

Part I Microbial diversity survey of deep-sea sediment of nodule province A station and its neighbor MP station

6. DNA extraction of deep-sea sediment.....	68
7. 16S rRNA gene PCR amplification of archaea and bacteria of deep-sea sediment.	69
8. 16S rRNA gene clones library construction and RFLP analysis.....	69

9. Description and comparison of the microbial diversity between MP and A stations.....	71
4.1 Bacterial diversity of A and MP stations.....	71
4.2 Archaeal diversity of A and MP stations.....	76
10. Discussion.....	83
5.1 Archaeal community of A and MP stations.....	84
5.2 Bacterial community of A and MP stations.....	85
Part II Microbial metagenomic cosmid library construction and subsequent research of deep-sea sediment of ES0303 nodule station	
7. DNA preparation of ES0303 deep-sea sediment.....	88
1.1 In situ lysis to extract DNA from deep-sea sediment.....	88
1.2 Collection of big inserted DNA fragment.....	89
1.3 Recovery and concentration control of the inserted DNA fragment.....	89
1.4 End-repair and concentration control of the inserted DNA fragment.....	90
8. Construction and evaluation of ES0303 cosmid metagenomic library.....	91
2.1 Construction of ES0303 cosmid metagenomic library.....	91
2.2 Evaluation of ES0303 cosmid metagenomic library.....	91
9. Microbial diversity investigation of ES0303 cosmid metagenomic library and deep-sea sediment of ES0303 station.....	93
3.1 16S rRNA gene libraries construction and microbial diversity survey.....	93
3.2 Bacterial diversity between ES0303 metagenomic cosmid library and ES0303 station.....	103
3.3 Discussion.....	108
3.4 Conclusion.....	111
10. Enzymes screening and lipase study of ES0303 metagenomic cosmid library.....	112
11. Screening and study of alkane monooxygenase.....	113

5.1 Screening and cloning of alkB gene fragment.....	113
5.2 Analysis of alkB gene fragments amplified from 9E7 and 21G8 cosmid clones.....	116
5.3 Confirmation and further study of alkB gene of 9E7and 21G8 cosmid clones.....	117
12. Screening and function study of bioactive compounds.....	120
6.1 Screening of antibiotics.....	120
6.2 Screening of anticancer bioactive compounds.....	122
Discussion	
1. Microbial diversity of deep-sea sediment of nodule province.....	129
2. Study of ES0303 cosmid metagenomic library.....	131
2.1 Big DNA fragment extraction.....	131
2.2 Microbial resource in ES0303 library.....	131
3. Alkane hydroxylase system in the deep-sea sediment of nodule province	133
4. Research and development of bioactive compounds from deep-sea microbes.....	134
5. Some views on environmental microbiology.....	135
5.1 “Uncultured bacteria”	135
5.2 Environmental microbial genomics.....	135
5.3 Strategy for future study of environmental microbiology.....	136
6. Conclusion.....	136
Reference.....	139
Appendix.....	154
4、 Projects participated in and papers published or in preparing.....	154
5、 Vectors used	156
6、 DNA Marker.....	158
Acknowledgements.....	160

太平洋多金属结核区深海沉积物微生物多样性研究和宏基因组文库的构建

摘 要

深海微生物的研究是现代海洋微生物的一个重要组成部分, 深海的天然极端环境, 导致了深海微生物的多样性, 引起了人们对处于深海极端环境下的微生物的广泛兴趣。本论文对中国多金属结核合同区深海沉积物样品中微生物多样性及微生物基因组资源的研究, 是该区域微生物生态系统研究的首次报道, 也是整个深海微生物生态系统调查研究中一个重要组成部分。相关结果可作为监测我国前期矿产资源调查基线资料, 并探讨太平洋地质构造运动对生物多样性形成的作用。

我们以中国多金属结核合同区内[COMRA (China)]的 A 站点 ($7^{\circ} 33' 46''$ N, $153^{\circ} 52' 19''$ W), 以及邻近的太平洋中部参照点 MP 站点 ($10^{\circ} 35' 06''$ N, $177^{\circ} 42' 20''$ W) 为研究对象, 利用系统发育学分析方法和多种分子生物学技术, 对各站点的深海沉积物样品中的微生物多样性进行了调查和比较。通过提取 A 站点和 MP 站点深海沉积物样品中的总 DNA, 构建了这些环境样品中细菌和古菌的 16S rRNA 基因文库, 对文库中的 16S rRNA 基因进行了 RFLP 分析、序列测定和系统发育学分析。结果表明: 在 A 站点细菌群落中, 最多的菌群是 *Gammaproteobacteria*。其中, *Shewanella* 细菌在 *Gammaproteobacteria* 亚群中最多, 该种群可能与 Fe (III) 和 Mn (IV) 还原相关。还检测到了绿色非硫细菌群 (GNS), 未知菌群 OP3, CFB 菌群以及一些无法归类的新菌群;

参照点 MP 站点的细菌群落结构组成和 A 站点类似，但是在 MP 站点并未发现新菌群和未知菌群 OP3；在 A 站点和 MP 站点监测到的古菌都属于 Group I 类群（*Crenarchaeotal* Nonthermophilic Marine Group I）。在此基础上构建了 A 站点和 MP 站点深海沉积物中细菌和古菌群落的系统进化树，阐述了两个站点深海沉积物中细菌和古菌群落的种群结构及其相互间的进化关系。

本研究中还构建了多金属结核合同区 ES0303 站点（8° 21' 11" N，145° 24' 09" W）深海沉积物样品中微生物群落宏基因组 cosmid 文库，获得了至少 3500 个克隆子，每个克隆子外源插入片段平均达到了 35Kb 以上。利用分子生物学方法对这个构建的深海微生物基因组大分子库进行了初步的研究。首先，以上述分子系统发育学分析方法对该宏基因组文库以及 ES0303 站点的深海沉积物样品中的微生物多样性进行了调查和比较，构建了相应的细菌 16S rRNA 基因文库；采用 RFLP 和 DGGE 两种方法对各个 16S rDNA 克隆子库进行了分析，获得了 ES0303 站点深海沉积物样品及其基因组大分子库的微生物多样性信息。分析结果表明这些发现的菌群和数据库中最匹配序列同源性都较低，绝大部分都在 90% 以下（74—89%），说明在 ES0303 cosmid 宏基因组文库中确实包含了类群较为丰富的微生物，而且这些细菌应该都是一些尚未获得培养和鉴定的新类群/种菌株，其分类地位尚未确定。在 ES0303 cosmid 大分子库中和 ES0303 站点沉积物样品中都监测到的、可能的共有菌株类群包括 *Proteobacteria* (Gamma 亚群和 Delta 亚群)、*Gemmatimonadetes*、*Planctomycetes* 以及部分新的未知菌群，在 ES0303 cosmid 大分子库中还监测到 *Chloroflexi* 菌株类群的存在，而在 ES0303 深海沉积物样品中则多了 *Alphaproteobacteria*、*Actinobacteria* 以及 *Nitrospirae*。其次，利用各种酶类功能筛选平板，进行了脂酶、淀粉酶、几丁质酶、半乳糖苷酶、蛋白酶以及锰氧化酶等酶活筛选，得到了一株具有明显脂酶活性的克隆子。再次，针对样品特点，利用特异引物及相应探针，以 PCR 扩增和杂交等方法对该基

基因组文库进行了各种不同功能基因，包括压力调节相关基因、EPA 合成基因、几丁质酶基因、锰氧化还原酶基因、甲烷氧化还原基因以及烷烃单加氧酶基因等的筛选，获得了两株具有不同烷烃单加氧酶基因的克隆子。最后，提取了全部克隆子的胞外和胞内活性物质，进行了抗细菌抗生素和抗癌活性物质的分析，筛选到多株具有较强抗细菌和抗癌细胞活性的 cosmid 克隆子。

本研究调查了中国多金属结核合同区中两个站点以及一个邻近参照站点沉积物样品中的微生物多样性，为政府在保护深海环境资源前提下，尽量减少人为破坏以更合理地开发多金属结核区提供了微生物生态系统基线资料；初步探讨了深海生物圈对地球物质循环的贡献。所构建的深海沉积物微生物宏基因组文库覆盖了至少 117Mbp 的深海微生物基因组，克服了常规培养等研究手段的局限性，获得了较为丰富的深海微生物群体遗传信息；而且其中包含的微生物绝大部分都是尚未获得培养或鉴定的新的细菌类群或新的菌种，为寻找深海微生物新基因以及与生长适应机制相关的功能基因、开发海洋药物资源等方面的研究提供了丰富的生物材料。预期随着后续研究的进一步展开，在该宏基因组文库中还可以找到更多生物活性物质，并发现相关的未培养微生物特殊代谢途径。

关键词： 中国多金属结核区合同区；深海沉积物；微生物多样性；宏基因组文库；生物活性物质

Microbial diversity investigation and metagenomic library construction of the deep-sea sediments collected from nodule province of Pacific

Abstract

The Pacific nodule province covers about 4.5 million km² in the eastern tropical Pacific with abundance of polymetallic nodules. One of the key responsibilities of the International Seabed Authority is to organize and control activities in the nodule area, with a view to administering its resources and ensuring that the marine environment is protected from man-made disturbance. Microbes are believed to play large roles in the metal cycling in many environments, but the microbial community in the Pacific nodule province has never been studied. In respect of the protection and preservation of the marine environment and demonstration the roles of microbes in the nodule areas, biodiversity and species geographic range in this province should be known.

Phylogenetic studies based on 16S rRNA gene sequence analysis were used to study the microbial populations in the deep-sea sediment of Pacific nodule province A core (7°33'46" N, 153°52'19" W) and its neighbor MP core (10°35'06" N, 177°42'20"W). Bacterial 16S rRNA gene sequence analysis demonstrated that *Proteobacteria* division mainly of Gamma subgroup dominated the microbial community of the nodule province A core. Among the Gamma subgroup,

Shewanella species which were known as Fe (), Mn () reducing bacteria were found prevalent. Besides *Proteobacteria*, Green nonsulfur bacteria, the candidate subdivision OP3, Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) bacteria and novel unidentified strains were also detected. MP core had similar community structure with A core. But new unidentified strains which might be environmental specific and the candidate subdivision OP3 were only detected in A core. Archaeal 16S rDNA sequence analysis and hybridization results showed that all detected Archaea in these two stations belonged to Crenarchaeotal Nonthermophilic Marine Group I.

A metagenomic cosmid library containing about 3500 clones with an average inserted DNA fragment above 35kbp was constructed using the deep-sea sediment sample collected from another nodule province ES0303 core (8°21'11" N, 145°24'09"W) to obtain more information about the microbial assemblages. Molecular phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene showed that most of the detected microbes consisted in the ES0303 metagenomic cosmid library might belong to novel candidate groups or species because of the quite low similarity value (about 74–89%) with the match sequences in databases. It indicated that the ES0303 metagenomic library contained abundant unknown microbial resources. Based on the phylogenetic analysis result, the possible groups of *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes* and some unclassified groups were all detected in both ES0303 deep-sea sediment sample and ES0303 metagenomic cosmid library. The *Chloroflexi* group was only detected in ES0303 metagenomic cosmid library. And the *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Nitrospirae* group were found only in ES0303 deep-sea sediment sample. One lipolytic clone was found in ES0303 metagenomic cosmid library after enzymes activities screening of lipase, amylase, chitinase,

galactosidase, protease and Mn oxidase using the different screening plates. PCR and hybridization methods were performed to screen the functional genes, including pressure regulation related genes, EPA gene clusters, chitinase gene, Mn reduced and oxidative related genes, methane reduced and oxidative related genes and alkane monooxygenase related genes. Two cosmid clones were proved to contain quite different alkane monooxygenase related genes. The endocellular and extrocellular crude extraction of all the cosmid clones were extracted to screen out the biological active matter of antimicrobial antibiotic and anticancer antibiotic. A lot of clones, which were proved to produce the antimicrobial antibiotic and anticancer antibiotic, were found. Further studies should be continued to obtain more information from the cosmid library.

Our study is the first study of microbial diversities of nodule province. Our results could be served as one of the bio-monitors for the future potential perturbing by commercial mining and provide the possible insights into the geochemical cycle of matter. The cultured-independent metagenomic library construction method provides a way for the study of uncultured microorganisms, such as the new metabolic pathways and new bioactive compounds synthesis. In our study, the ES0303 metagenomic cosmid library contain at least 117Mbp of the genomic resource of deep-sea microbes, most of which have been proved to be uncultured and unidentified novel species, and provide abundance resource for subsequent further research. More stirring results might be obtained from the ES0303 metagenomic library along with further studies.

Keywords : nodule province ; deep-sea sediment ; Microbial diversity ; metagenomic library; bioactive compounds

前言

一、序

微生物的重要性：著名的法国科学家路易斯·巴斯德（Luois Pasteur），微生物学奠基人之一，是这样形容微生物的：“在自然界中，它无限小，但作用无限大”。微生物是地球生物圈的基础，几乎所有的生命都依赖于微生物。微生物对于生物学的发展具有重大的贡献。在基础生命科学研究中，微生物是研究动、植物细胞功能的理想模式，通过对微生物的研究阐明了生命活动过程中本质的物理和化学原理；同时，在应用科学研究中，微生物在医学、农业以及工业中涉及广泛，微生物学可以解决许多重要的实际问题。微生物学是最重要的生物学科之一。研究微生物的多样性和进化，以及不同种类的微生物是如何产生及产生的原因；研究微生物在人类社会，以及在人体、动植物体中的作用；这两个研究方向是微生物学研究的主要内容之一^[1]。

深海环境：海洋是生命的诞生和孕育之地，生物的进化历程表明，地球上的生物起源于海洋。海洋不但占据了地球 71% 的表面积，而且提供了 99% 的生物可栖息的地方。海洋不但是海洋生物的庇护所，而且主宰着地球的气候变化和物质循环，是地球生态链中重要的一环。所谓深海，一般指 1000 米以下的水域，营养相对较为贫乏，其间生物活动相对较少；深海沉积物则是由海洋表层及海洋中不断下降的沉降物累积形成，包含了较为丰富的营养要素，有机物和无机物含量一般都比深海海水中高，生存着各种深海微生物。海洋的 75% 以上海域是深海，而其中深海沉积物覆盖了地球表层的 50% 以

上^[1]。深海及深海沉积物中的微生物生存面临高压，低温、黑暗及低营养水平等几个主要极端环境。占地球总水量 97% 的海洋，生物资源丰富，种类繁多。据统计大约有 20 多万种生物生存在海洋中，相对于地球上其他生命栖息地而言，深海存在着更为大量且鲜为人知的生物资源，其生物多样性远远超过陆地生物的多样性。

深海微生物研究的重要性：海洋微生物是海洋生态系统中最重要的重要组成部分，是海洋生物研究中的一个重要领域^[2]。深海微生物的研究是现代海洋微生物的一个重要组成部分。极端环境下的微生物是系统进化研究中研究生命起源演化的重要材料。深海微生物和地球的有机物碳、氮、硫循环关系密切，是地球物质循环不可分割的重要参与者。因此，深海微生物有哪些种类、特点、极端环境的适应性机理、特殊代谢产物及其利用价值等，都引起了人们广泛的兴趣。深海微生物的研究区域分布广泛，从太平洋（Pacific Ocean）包括最深处马里亚纳海沟（Mariana Trench）、大西洋（Atlantic Ocean.）、北冰洋（Arctic Ocean）、南极海（Antarctic Ocean）、地中海（Mediterranean）、圣巴巴拉海峡（Santa Barbara channel）到菲律宾海盆（Philippine Basin）及日本海沟（Japan Trench）等等。目前国际上进行深海微生物研究的国家主要分布在欧洲，美洲及亚洲，其中美国、日本、德国、英国和法国都是深海微生物研究的主力军。目前，在深海微生物的分离培养、多样性调查、功能基因研究和适应性机制研究（如深海嗜压菌的嗜压机制）等方面取得了一定的进展；各类极端微生物在工业用酶、工具酶、环境修复以及生物活性物质等方面的开发应用，也有了突破，使人们看到了深海微生物开发的巨大潜力和广阔的应用前景^[3]。2003 年 10 月份开始的整合大洋钻探计划（IODP）将深部生物圈和洋底下的海洋列为该计划中三大科学课题之首，深海生物资源尤其是微生物资源越来越得到人类的重视。随着科学的发展进步，水下工程技术和探测技术的改进和完善，人类对深海微生物的研究和开发有了更大的空间

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库